



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101160409 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 200680011995.5

(22) 申请日 2006.04.12

(30) 优先权数据

60/670,437 2005.04.12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.10.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/014146 2006.04.12

(87) PCT申请的公布数据

W02006/110901 EN 2006.10.19

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 J·B·邓森 M·特克 R·埃兰德

S·M·亨尼西

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘健 段家荣

(51) Int. Cl.

C12P 19/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1085230 A, 1994.04.13, 全文.

MASAHIRO KURAKAKE 等. Pretreatment with Ammonia Water for Enzymatic Hydrolysis of Corn Husk, Bagasse, and Switchgrass. 《Applied Biochemistry and Biotechnology》. 2001, 第 90 卷第 251-259 页.

许凤等. 木质纤维原料生物转化燃料乙醇的研究进展. 《纤维素科学与技术》. 2004, 第 12 卷 (第 1 期), 第 45-54 页.

审查员 王航

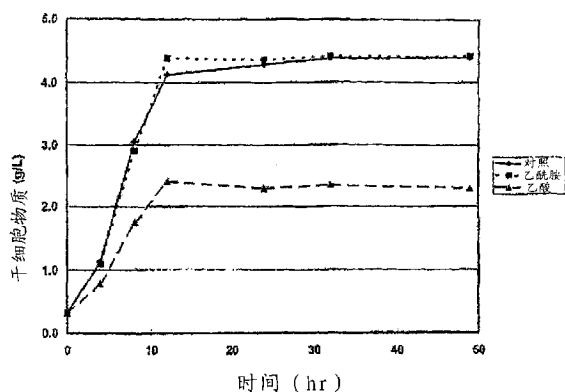
权利要求书2页 说明书28页 附图1页

(54) 发明名称

获得可发酵糖的生物质处理方法

(57) 摘要

使用低浓度的氨水在高生物质浓度下预处理生物质。预处理生物质进一步用糖化酶聚生体水解。由糖化释放的可发酵糖可用于通过发酵制备目标化学品。



1. 一种处理生物质以产生可发酵糖的方法,其包括:

a) 将生物质与氨水接触以形成生物质-氨水混合物,其中氨以至少足以使生物质-氨水混合物的 pH 保持为碱性的浓度存在,但是其中所述的氨以相对于生物质干重小于 12 重量百分比的量存在,并且进一步地其中生物质干重处于相对于生物质-氨水混合物重量至少 15 重量百分比的高固体浓度,以产生预处理生物质产物;和

b) 将步骤 a) 的产物在适当的条件下与糖化酶聚生体接触,以产生可发酵糖,其中所述的糖化酶聚生体包含一种或多种酶,所述酶选自水解二-、低聚-和多聚糖的醚键的“糖苷酶”组。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中生物质-氨水混合物的 pH 大于 8。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中在将生物质与氨水接触前对生物质抽真空。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述生物质干重处于从 15% 到 80% 的高固体浓度。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述生物质干重处于从 15% 到 60% 的高固体浓度。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的氨以相对于生物质干重小于 10 重量百分比的量存在。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述的氨以相对于生物质干重 6% 或更小重量百分比的量存在。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中生物质选自生物能源作物、农业废物、木材和林业废物。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中生物质选自柳枝稷、废纸、造纸淤渣、草、甘蔗渣、从谷物加工中获得的组分、树木、木屑、蔬菜、果实、花和牲畜粪。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中生物质选自玉米芯、玉米秸、玉米皮、甘蔗渣、锯屑、柳枝稷、小麦秸秆、大麦秸秆、稻草秸秆和草。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中生物质选自玉米芯、玉米秸、锯屑和甘蔗渣。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中氨选自氨气、氢氧化铵、尿素及其组合。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中(a) 在从 4°C 到 200°C 的温度下进行。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中(a) 在从 75°C 到 150°C 的温度下进行。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中(a) 在大于 90°C 的温度下进行。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中(a) 进行的时间最长至 25 小时。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中(a) 进行的时间最长至 8 小时。

18. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中在(b) 之前至少除去 a) 中的一部分氨。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中来自(a) 的氨被再循环。

20. 如权利要求 1 所述的方法,其中(b) 的接触是在至少 15% 的生物质干重浓度下进行的。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其中(a)、(b) 或者(a) 和(b) 至少被重复一次。

22. 如权利要求 1 所述的方法,其进一步包括在(a) 之前或期间,在(b) 之前或期间,或者其组合中施加能量。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其中所述的能量选自磨、压、切、砍、超声和微波。

24. 如权利要求 1 所述的方法,其中将来自发酵的二氧化碳用于在糖化前调节预处理

混合物的 pH 值。

25. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的糖化酶聚生体包含至少一种糖苷酶。

26. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的糖化酶聚生体包含至少一种选自纤维素-水解糖苷酶、半纤维素-水解糖苷酶、淀粉-水解糖苷酶、肽酶、脂肪酶、木质素酶和阿魏酸酯酶的酶。

27. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的糖化酶聚生体包含至少一种选自纤维素酶、内葡聚糖酶、外葡聚糖酶、纤维生物水解酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶、甘露聚糖酶、半乳糖酶、果胶酶、葡萄糖苷酸酶、淀粉酶。

28. 如权利要求 1 所述的方法,其中(b)是在从 15℃到 100℃的温度下和从 2 到 11 的 pH 下进行的。

获得可发酵糖的生物质处理方法

[0001] 本申请要求了 2005 年 4 月 12 日登记的美国临时申请 No. 60/670437 的优先权。

[0002] 政府权利的声明

[0003] 本发明是在美国政府的支持下作出的,能源部授予的合同为 No. 04-03-CA-70224。政府对本发明具有某些权利。

发明领域

[0004] 本发明提供了处理生物质以获得可发酵糖的方法。具体地说是,通过在高固体浓度和低氨浓度条件下预处理生物质接着进行糖化来获得可发酵糖。

[0005] 发明背景

[0006] 纤维素和木质纤维原料和废物,例如农业废物、木材、林业废物、造纸淤渣以及城市和工业固体废物为化学、塑料、燃料和饲料的生产提供了大量潜在的可再生原料。纤维素和木质纤维原料和废物由包含纤维素、半纤维素、葡聚糖和木质素的碳水化合物聚合物组成,其通常通过各种化学、机械和酶方法进行处理以释放主要的己糖和戊糖,接着可被发酵成有用的产品。

[0007] 预处理方法是用来使纤维素和木质纤维材料的碳水化合物聚合物更容易被糖化酶利用的。历史上标准的预处理方法主要是在高温下利用强酸;然而,由于高能耗、高设备成本、高预处理催化剂回收成本以及与糖化酶的不相容性,正在开发替代方法,例如酶的预处理,或者在预处理过程中生物质碳水化合物聚合物水解减少时在较温和的温度下使用酸或碱,这需要改善酶系统以使纤维素和半纤维素糖化。

[0008] 已经提出了许多利用碱的预处理方法。Gould(Biotech. and Bioengr. 1984) 26 : 46-52) 公开了使用过氧化氢 (H_2O_2) 的对木质纤维素生物质的预处理方法。该处理方法在以相对于底物至少 0.25wt/wt 的量使用 H_2O_2 时最有效。

[0009] Teixeira, L. 等人 (App. Biochem. and Biotech. (1999) 77-79 : 19-34) 公开了一系列使用化学剂量的氢氧化钠和氢氧化铵,在极低生物质浓度下的生物质预处理。溶液与生物质的比例为 14 : 1。

[0010] Elshafei, A. 等人 (Bioresource Tech. (1991) 35 : 73-80) 检验了利用 NaOH 对玉米秸的预处理。

[0011] Kim, T. 和 Y. Lee (Bioresource Technology (2005) 96 : 2007-2013) 报导了使用大量氨水用于玉米秸的预处理。

[0012] 专利申请 W02004/081185 讨论了水解木质纤维的方法,其包括在约 9 到约 14 的 pH 下,在温和的温度、压力和 pH 条件下,将木质纤维与化学品接触;所述化学品可以是碱,例如碳酸钠和氢氧化钾。

[0013] 美国专利 Nos. 5, 916, 780 和 6, 090, 595 描述了一种预处理方法,其中确定了阿拉伯糖基木聚糖与总非淀粉聚糖 (AX/NSP) 的具体比例并且将其用于选择原料。

[0014] 为了成为经济的有竞争性的方法,由可再生来源生物质制备可发酵糖的工业化方法需要使用少量的化学品对木质纤维生物质中的碳水化合物进行水解从而提供高产率的

高浓度糖,以将具有低毒性的可发酵糖源制备成发酵的有机体,该制备过程将糖转化成具有附加价值的化学品和燃料。

[0015] 发明简述

[0016] 本发明提供了一种处理生物质以产生可发酵糖的方法。本发明的方法涉及预处理步骤,其中相对于生物质干重用低浓度的氨处理相对较高浓度的生物质。预处理后,用糖化酶聚生体(saccharification enzymeconsortium)处理生物质以产生可发酵糖。在发明的一个实施方案中,所述方法包括:

[0017] a) 将生物质与含氨的水溶液接触以形成生物质-氨水混合物,其中氨以至少足以维持生物质-氨水混合物的碱性 pH 的浓度存在,但是其中所述氨以相对于生物质干重少于约 12 重量百分比存在,并且进一步地其中生物质干重处于相对于生物质-氨水混合物重量至少约 15 重量百分比的高固体浓度;和

[0018] b) 将步骤(a)的产物与糖化酶聚生体在适当的条件下接触以产生可发酵糖。

[0019] 生物质是指任意的纤维素或木质纤维材料,例如,生物能源作物、农业废物、城市固体废物、工业固体废物、庭院废物、木材、林业废物,以及它们组合。所述含有氨的水溶液可以来源于氨气、氢氧化铵、尿素及其组合。根据发明的方法,含氨的水溶液可以包含至少一种另外的碱。此外,根据本发明的方法,在将生物质与含氨的水溶液接触之前可以对所述生物质抽真空。还可以在步骤(b)之前将氨除去;氨可以被循环回预处理反应器中。所述氨和生物质可以在约 4°C 到约 200°C 的温度下以本发明的方法进行反应。在本发明的方法中可以使用增塑剂、软化剂或其混合物。此外,在步骤(a)之前或期间、步骤(b)之前或期间、或者其组合,可向生物质施加能量用以减小尺寸,增加暴露的表面积,和/或增加存在于生物质中的纤维素、半纤维素和/或低聚糖的可达性(accessability)。

[0020] 所述糖化酶聚生体可以包含一种或多种糖苷酶;该糖苷酶可以选自纤维素-水解糖苷酶、半纤维素-水解糖苷酶和淀粉-水解糖苷酶。糖化酶聚生体中的其它酶可以包括肽酶、脂肪酶、木质素酶和阿魏酸酯酶(feruloyl esterases)。

附图简介

[0021] 图 1 显示了存在或不存在乙酰胺和乙酸的运动发酵单胞菌 8b(*Zymomonas mobilis* 8b)(描述于美国专利公开 2003/0162271 A1,实施例 IV、VI 和 XII 中)的生长。

[0022] 发明详述

[0023] 申请人在本公开文本中明确地引入了所有引用参考文献的全部内容。进一步地,当数量、浓度或者其它值或参数作为优选上限值和优选下限值的范围、优选范围或者列举而给出时,其应被理解为具体地公开了由任意一对任意上限范围或优选值和任意下限范围或优选值所形成的全部范围,而不论这些范围是否被分别地公开了。在这里,在描述数值范围时,除非另外指明,所述范围应意图包括其端点,以及所述范围内的所有整数和分数。不应认为发明的范围被限定为定义范围时所描述的具体数值。

[0024] 本发明提供了一种处理生物质以产生可发酵糖的方法;该方法包括预处理步骤,其中用相对于生物质干重相对较低浓度的氨处理处于相对较高浓度的生物质。接着用糖化酶聚生体消化氨-处理后的生物质以产生可发酵糖。

[0025] 定义:

[0026] 在本公开文本中,使用了许多术语。提供以下定义:

[0027] 术语“可发酵糖”是指可以在发酵过程中被微生物用作碳源的低聚糖和单糖。

[0028] 术语“木质纤维”是指包含木质素和纤维素二者的组合物。木质纤维材料也可以包含半纤维素。

[0029] 术语“纤维素”是指包含纤维素的组合物。

[0030] 生物质的“干重”的意思是指除去所有或基本上所有水的生物质的重量。干重一般根据美国材料与试验协会 (ASTM) 标准 E1756-01 (确定生物质中固体量的标准试验方法) 或者纸浆与造纸工业技术协会,有限公司 (TAPPI) 标准 T-412om-02 (纸浆、纸张和纸板中的含水量) 而测定。

[0031] 术语“目标化学品”是指由发酵制备的化学品。化学品以其广义使用,并且包括分子例如蛋白质,包括,例如,肽、酶和抗体。

[0032] “来源于生物质”的目标化学品是由下述方法产生的目标化学品,即将生物质水解以释放可发酵糖,将该可发酵糖用至少一种生物催化剂进行发酵以产生期望的目标化合物。

[0033] 术语“增塑剂”和“软化剂”是指引起沿着聚合物链或在聚合物链之间的内聚分子间力减小的材料。这样的材料可以起到,例如,降低结晶性,或者使木质素和非木质素碳水化合物纤维 (例如,纤维素或半纤维素) 之间的键断裂的作用。

[0034] 术语“糖化”是指由多糖产生可发酵糖的过程。

[0035] 术语“预处理生物质”的意思是指在糖化前已经进行了预处理的生物质。

[0036] “生物质”是指任意的纤维素或木质纤维材料,以及包括包含纤维素并且任选进一步地包含半纤维素、木质素、淀粉、低聚糖和 / 或单糖的材料。生物质还可以包含附加组分,例如蛋白质和 / 或脂质。根据发明,生物质可以源自单一来源,或者生物质可以包含源自多于一种来源的混合物;例如,生物质可以包含玉米芯和玉米秸的混合物,或者草和叶子的混合物。生物质包括,但不限于,生物能源作物、农业废物、城市固体废物、工业固体废物、造纸淤渣、庭院废物、木材和林业废物。生物质的例子包括,但不限于,玉米粒、玉米芯、作物残余物例如玉米皮、玉米秸、草、小麦、小麦秸、大麦、大麦秸、干草、稻秆、柳枝稷 (switchgrass)、废纸、甘蔗渣、高粱、大豆、由谷物磨房获得的组分、树木、树枝、树根、树叶、木屑、锯屑、灌木和矮树、蔬菜、果实、花和牲畜粪。在一个实施方案中,可用于发明的生物质包括具有相对较高碳水化合物值的生物质,其是相对致密的,和 / 或相对容易收集、运送、存储和 / 或处理的。在发明的一个实施方案中,可使用的生物质包括玉米芯、玉米秸和甘蔗渣。

[0037] 为了本发明的目的,“含氨的水溶液”是指在水介质中使用氨气 (NH_3)、含有铵离子 (NH_4^+) 的化合物例如氢氧化铵或硫酸铵,在降解过程中释放氨的化合物例如尿素,以及它们的组合。

[0038] 用于本发明方法中的氨的浓度是足以使生物质-氨水混合物的 pH 保持为碱性的最低浓度,并且其最大为相对于生物质干重小于约 12 的重量百分比。该低浓度的氨对预处理来说是足够的,并且所述低浓度还可以是相对于生物质干重小于约 10 重量百分比。相对于生物质干重百分之 6 或更低的极低浓度的氨也可以用于预处理。碱性的意思是指大于 7.0 的 pH。特别合适的是大于 8 的生物质-氨水混合物 pH。在一个实施方案中,氨以相对于生物质干重小于约 10 重量百分比存在。特别合适的是氨为相对于生物质干重小于约 6

重量百分比。

[0039] 用于本发明方法中的氨与其它碱相比提供了优点。氨分成液相和气相。气态氨能够比液体碱更加容易地扩散通过生物质,导致在较低浓度下更有效的预处理。氨还被显示于本文的实施例 11 中,其通过生物质中乙酰基酯的氨解来与水解竞争,从而形成乙酰胺。乙酰胺对某些发酵有机体,例如运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) (如本文实施例 12 中所示),的毒性比乙酸酯的低。这样的从乙酰基酯到乙酰胺而不是到乙酸的转化减少了除去乙酸的需要。氨的使用还减少了在用氮源发酵的过程中补充所使用的生长培养基的要求。另外,氨是一种廉价的材料,因此提供了一种经济的方法。还可以将氨在预处理期间或预处理之后循环到预处理反应器中,从而获得一个更加经济的方法。例如,在预处理后,随着温度降低至适于糖化的温度,氨气可以被释放,任选地在真空的存在下,氨气可以被再循环。在一个连续的方法中,氨可以被连续地再循环。

[0040] 根据本发明方法,包含氨的水溶液可以任选地包含至少一种另外的碱,例如氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、碳酸钾、氢氧化钙和碳酸钙。所述至少一种另外的碱的加入量可以是能与铵结合形成相对于生物质干重小于约 20 重量百分比量的总碱的量。优选地,全部的第二种碱加上氨的量小于约 15 重量百分比。可以利用另外的碱来,例如,中和生物质中的酸,以提供用于糖化酶的金属离子,或者提供用于发酵生长培养基的金属离子。

[0041] 在本发明方法中,生物质干重的初始浓度至少为生物质-氨水混合物重量的约 15% 直至约 80%。更合适地,生物质干重的浓度为生物质-氨水混合物重量的约 15% 到约 60%。为了用于发酵,将生物质-氨水混合物中的生物质的百分比保持高水平以使对糖进行浓缩的需要最小化,所述糖是由糖化预处理生物质而产生的。高的生物质浓度还减少了预处理材料的总体积,使得该方法更加经济。

[0042] 生物质可以以从来源中所获得的形式而直接使用,或者可以向生物质施加能量以减小尺寸,增加暴露的表面积,和/或增加存在于生物质中的纤维素、半纤维素、和/或低聚糖对氨以及对用于方法第二步中的糖化酶的利用率。对减少尺寸,增加暴露的表面积,和/或增加存在于生物质中的纤维素、半纤维素、和/或低聚糖对氨以及对糖化酶利用率的有效能量形式包括,但不限于,磨、压、碾、切、砍、盘磨、超声和微波。能量的这种施加可以发生在预处理之前或期间,糖化之前或期间,或者其任意组合。

[0043] 用氨溶液的生物质预处理可以在任何合适的容器内进行。一般地该容器是能够承受压力,具有加热机械装置,并且具有混合各组分的机械装置的容器。可商购获得的容器包括,例如,Zipperclave[®] 反应器 (Autoclave Engineers, Erie, PA)、Jaygo 反应器 (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ) 和蒸汽枪反应器 (General Methods Autoclave Engineers, Erie, PA 中所描述的)。可以使用具有相似性能的规模大得多的反应器。替代性地,可以将生物质和氨溶液在一个容器中结合后,接着再转移到另一个反应器中。还可以将生物质在一个容器中预处理后,接着再进一步在另一个反应器例如蒸汽枪反应器 (General Methods ; Autoclave Engineers, Erie, PA 中所描述的) 中进行加工。

[0044] 在将生物质与含氨的水溶液接触之前,可以对含有生物质的容器抽真空。通过从生物质的气孔中排出空气,可以使氨更好地渗入生物质中。抽真空的时间长度和向生物质施加的负压力的的大小取决于生物质的类型并可根据经验来确定以便获得最佳的生物质预处理 (是通过糖化作用后可发酵糖的产生情况而测定的)。

[0045] 生物质与含氨的水溶液的接触是在从约 4℃ 到约 200℃ 的温度下进行的。生物质与氨的初始接触是在 4℃, 在该温度下能够发生浸透作用, 发现与未预处理的天然生物质相比该接触过程增加了糖化作用的效率。在另一个实施方案中, 所述的生物质的接触在从约 75℃ 到约 150℃ 的温度下进行。在又一个实施方案中, 所述的生物质的接触在从大于 90℃ 到约 150℃ 的温度下进行。

[0046] 将生物质与含氨的水溶液接触所进行的时间能够长至约 25 小时。较长的预处理时间也是可能的, 然而由于操作、经济的原因优选较短的时间长度。一般地, 氨接触处理的时间长度为约 8 小时或更短。较长的处理时间长度可以带来下述益处, 即减少了对为破碎生物质而施加的能量的需求, 因此, 长至约 25 小时的时间长度可能是优选的。

[0047] 在一个实施方案中, 预处理过程可以在相对较高的温度下进行相对较短的时间, 例如在从约 100℃ 到约 150℃ 下进行约 5 分钟到约 2 小时。在另一个实施方案中, 预处理过程可以在较低的温度下进行相对较长的时间, 例如在从约 75℃ 到约 100℃ 下进行约 2 小时到约 8 小时。在又一个实施方案中, 预处理过程可以在室温 (大约 22-26℃) 下进行甚至更长的时间, 为约 24 小时。还可以使用在这些范围中间的其它温度和时间的组合。

[0048] 对于预处理过程, 温度、预处理时间、氨的浓度、一种或多种另外的碱的浓度、生物质浓度、生物质类型和生物质粒子大小是相关的; 因此这些变量可以根据获得要与糖化酶聚生体接触的最佳产物的需要而调整。

[0049] 增塑剂, 软化剂或其组合, 例如多元醇 (例如, 甘油、乙二醇), 多元醇酯 (例如, 单乙酸甘油酯), 二醇醚 (例如, 一缩二乙二醇), 乙酰胺, 乙醇和乙醇胺, 都可以在预处理过程中 (即, 步骤 (a)) 加入。可以将增塑剂作为氨水溶液的一个组分、作为单独的溶液或者作为干组分而加入。

[0050] 预处理反应可以在任何合适的容器中进行, 例如间歇式反应器或连续式反应器。本领域技术人员能够认识到在较高的温度 (大于 100℃) 下, 需要压力容器。合适的容器可以装备有一些装置, 例如高速搅拌机, 用于搅拌生物质-氨水混合物。反应器的设计在 Lin, K. -H. 和 Van Ness, H. C. (在 Perry, R. H. 和 Chilton, C. H. (编辑), Chemical Engineer's Handbook, 第 5 版 (1973) 第 4 章, McGraw-Hill, 纽约) 中有所讨论。预处理反应可以作为间歇过程, 或者作为连续过程而进行。

[0051] 发酵期间微生物生长需要氮源是本领域技术人员所公知的; 因此在预处理期间氨的使用提供了氮源并且减少或消除了发酵期间用氮源补充所消耗的生长培养基的需要。如果预处理产品的 pH 超过了糖化酶具有活性时的 pH, 或者超过了适于微生物在发酵中生长的范围, 可以利用酸来减少 pH。用来获得期望 pH 的酸的量可能会导致抑制糖化酶或者抑制微生物生长浓度的盐的形成。为了减少获得期望 pH 所需的酸的量, 并且为了在本预处理过程中减少 NH_3 的原料损耗, 可以将氨气从预处理反应器中排出并且重复利用。一般地, 至少移除一部分氨, 其减小了 pH 却留有一些氨, 这些氨提供了氮营养物以用于后续的发酵。

[0052] 为了从生物质中获得足够量的糖, 可以将生物质用氨水溶液预处理一次或者超过一次。同样地, 糖化反应可以进行一次或超过一次。如果期望获得较高的糖产率, 预处理和糖化过程二者均可以被重复进行。为了评价预处理和糖化过程的性能, 可以分别地或一起地确定来源于初始生物质的糖的理论收率, 并且将其与所测得的产率进行比较。

[0053] 糖化:

[0054] 预处理后,产物包含氨、部分降解的生物质和可发酵糖的混合物。在进一步处理之前,可以通过抽真空将氨从预处理生物质中除去。氨的除去降低了 pH 并且因此减少了中和酸的用量,所述中和酸是用以获得期望 pH 以进行糖化和发酵的。其导致了预处理混合物中的较低的含盐量。一般地保留一些氨,希望其能为发酵提供氮源。

[0055] 接着,在糖化酶聚生体的存在下将预处理混合物进一步水解从而在水解产物中释放低聚糖和 / 或单糖。用于生物质处理的糖化酶和方法综述于 Lynd, L. R. 等人的 (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66 :506-577) 中。在一个优选实施方案中,糖化反应中利用了包含可溶和不溶组分二者的全部的预处理混合物。

[0056] 在另一个实施方案中,在糖化之前,可以将包含氨和溶解糖的含水组分与剩余在混合物中的不溶颗粒分离。从不溶组分中分离可溶组分的方法包括但不限于,倾析和过滤。可以将不溶颗粒再循环入预处理反应器中。任选地可以用含水溶剂(例如水)洗涤不溶颗粒以在再循环入预处理反应器之前除去吸附的糖。接着可以用如上所述的用于预处理的氨水溶液对不溶组分进行另外的处理,随后用糖化酶聚生体进行糖化。再糖化之前还可以使用适当的方法,例如蒸发,对可溶组分进行浓缩。

[0057] 在糖化之前,可以对预处理产物进行处理以改变 pH、组成或温度从而使糖化酶聚生体的酶能够被活化。pH 可以通过加入固体或液体形式的酸而得到改变。替代性地,可以利用二氧化碳(CO₂)来降低 pH,所述二氧化碳可以从发酵中回收。例如,可以将 CO₂ 从发酵罐和原料中,例如通过鼓泡而收集到预处理产物中,同时监测 pH 直到获得期望的 pH。如下面所提到的,可以将温度提高到与糖化酶活性相适合的温度。可以加入用于糖化作用的酶起作用所需的任何辅助因素。

[0058] 糖化酶聚生体包含一种或多种酶,所述酶主要选自,但不限于,“糖苷酶”组,其水解了二-、低聚-和多聚糖的醚键,并且可以在酶分类 EC 3.2.1.x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA with Supplement 1(1993), Supplement 2(1994), Supplement 3(1995), Supplement 4(1997) 和 Supplement 5[分别 在 Eur. J. Biochem. (1994) 223 :1-5, Eur. J. Biochem. (1995) 232 :1-6, Eur. J. Biochem. (1996) 237 :1-5, Eur. J. Biochem. (1997) 250 :1-6, 和 Eur. J. Biochem. (1999) 264 :610-650 中]) 的“水解酶”(EC 3.) 通用组中找到。可用于本发明方法的糖苷酶可以通过它们水解的生物质组分来进行分类。可用于本发明方法的糖苷酶包括纤维素-水解糖苷酶(例如,纤维素酶、内葡聚糖酶、外葡聚糖酶、纤维生物水解酶、β-葡萄糖苷酶),半纤维素-水解糖苷酶(例如,木聚糖酶、内木聚糖酶、外木聚糖酶、β-木糖苷酶、阿拉伯木聚糖酶、甘露聚糖酶、半乳糖酶、果胶酶、葡萄糖苷酸酶),和淀粉-水解糖苷酶(例如,淀粉酶、α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡糖淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、异淀粉酶)。此外,向糖化酶聚生体中加入其它活性物质以帮助从生物质的其它组分中释放多糖也可能是有效的,所述活性物质例如肽酶(EC 3.4.x.y),脂肪酶(EC 3.1.1.x 和 3.1.4.x),木质素酶(EC 1.11.1.x) 和阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)。本领域公知,产生多糖水解酶的微生物经常显示出某种活性,例如纤维素降解活性,其是由具有不同底物专一性的几种酶或者一组酶催化的。因此,来自微生物的“纤维素酶”可以包含一组酶,所有的这些酶都可具有纤维素-降解活性。商业或非商业的酶制品,例如纤维素酶,可以包含多种酶,这取决于为获得酶所使用的纯化方案。因此,本发明方法的糖化酶聚生体可以包含酶活性物,例如“纤维素酶”,然而,应该认识到该活性物可以被超过一种的酶催化。

[0059] 糖化酶可以商购获得,例如 Spezyme[®] CP 纤维素酶 (Genencor International, Rochester, NY) 和 Multifect[®] 木聚糖酶 (Genencor)。此外,糖化酶可以生物学地制备得到,包括使用重组微生物。

[0060] 本领域技术人员已知如何确定用于所述聚生体中的酶的有效量以及为了最佳的酶活性而如何调整条件。本领域技术人员还应已知如何优化所述聚生体内需要的酶活性的种类,以在所选择的条件下获得最佳的对给定预处理产物的糖化作用。

[0061] 优选地,糖化反应在或接近对于糖化酶最佳的温度和 pH 下进行。在本发明方法中糖化酶聚生体所使用的最佳温度范围为从约 15°C 到约 100°C。在另一个实施方案中,最佳温度范围为从约 20°C 到约 80°C。最佳 pH 的范围可以为从约 2 到约 11。在另一个实施方案中,本发明方法中糖化酶聚生体所使用的最佳 pH 的范围为从约 4 到约 10。

[0062] 糖化作用进行的时间可以是约几分钟到约 120 小时的时间,优选从约几分钟到约 48 小时。反应的时间取决于酶的浓度和具体活性,以及所使用的底物和环境条件,例如温度和 pH。本领域的技术人员可以很容易地确定温度、pH 和时间的最佳条件以用于特定的底物和糖化酶聚生体。

[0063] 糖化可以作为间歇或连续过程进行。糖化还可以在一个步骤中或者在多个步骤中进行。例如,糖化需要的不同酶可以显示出不同的最佳 pH 或温度。可以用酶在一个温度和 pH 下进行一级处理,接着用不同的酶在不同的温度和 / 或 pH 下进行二级或三级 (或者更多) 处理。此外,在连续的步骤中用不同酶的处理可以在相同的 pH 和 / 或温度下,或者在不同的 pH 和温度下进行,例如使用了在较高的 pH 和温度下稳定并更具活性的半纤维素酶后,接着使用在较低 pH 和温度下具有活性的纤维素酶。

[0064] 糖化后来自生物物质的糖的增溶度可以通过测量单糖和低聚糖的释放来进行监测。测量单糖和低聚糖的方法是本领域公知的。例如,还原糖的浓度可以使用 1,3-二硝基水杨 (DNS) 酸试验 (Miller, G. L., Anal. Chem. (1959) 31:426-428) 来确定。替代性地,糖可以通过 HPLC 而得到测定,所述 HPLC 使用了如上述文献中“常用方法 (General Methods)”部分所描述的适当的柱子。

[0065] 由生物物质释放的可发酵糖可以被适当的微生物使用而产生目标化学品。在糖化后发酵前,可以通过例如蒸发来浓缩糖化混合物以增加可发酵糖的浓度。任选地,可以将糖化产物中的液体以间歇或连续的方法与固体分离。任选地,可以在发酵之前对液态的或者全部的糖化产物进行灭菌。可以根据发酵期间所使用的微生物和糖化期间所使用的 pH,来调整 pH 以适于进行发酵。另外,可以向糖化混合物中补充附加的微生物生长所需的营养物。补充物可以包括,例如,酵母提取物、特定的氨基酸、磷酸酯、氮源、盐和微量元素。还可以包括产生由特定生物催化剂制备的特定产品所需的组分,例如抗生素以维持酶催化反应中所需的质粒或者辅助因素 / 辅剂。还可以包括另外的糖以增加总的糖浓度。糖化混合物可用作发酵肉汤的一个组分,例如,配制为占最终培养基的约 100% 到约 10%。

[0066] 温度和 / 或顶隙气体也可以根据可用于微生物发酵的条件而得到调整。发酵可以是需氧的或厌氧的。发酵可以发生在糖化之后,或者可以通过同时进行糖化和发酵 (SSF) 而与糖化同时发生。SSF 可以使由糖化作用产生的糖保持在低水平,从而减小了对糖化酶的潜在的产物抑制,减小了糖污染微生物的可能性,并且提高了从预处理生物物质到单糖和 /

或低聚糖的转化率。

[0067] 可以通过发酵而产生的目标化学品包括,例如,酸、醇、烷烃、烯烃、芳烃、醛、酮、生物聚合物、蛋白质、肽、氨基酸、维生素、抗生素和药物。醇包括,但不限于甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、甘油、赤藓醇、木糖醇和山梨醇。酸包括乙酸、乳酸、丙酸、3-羟基丙酸、丁酸、葡萄糖酸、衣康酸、柠檬酸、琥珀酸和菊芋糖酸(levulinic acid)。氨基酸包括谷氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。其它的目标化学品包括甲烷、乙烯、丙酮和工业酶。

[0068] 糖到目标化学品的发酵可以通过一种或多种适当的生物催化剂在单一的或多步的发酵中进行。生物催化剂可以是选自细菌、丝状真菌和酵母的微生物。生物催化剂可以是天然类的微生物,或者是重组的微生物,包括埃希氏菌、单胞发酵菌、酵母、念珠菌、毕赤酵母(*Pichia*)、链球菌、杆菌、乳酸菌和梭菌。在另一个实施方案中,生物催化剂可以选自重组的大肠杆菌(*Escherichia coli*),运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*),嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),热纤梭菌(*Clostridia thermocellum*), *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* 和毕赤酵母(*Pichia stipitis*)。

[0069] 已经描述了许多用于发酵以制备目标化学品的生物催化剂,并且其它的生物催化剂也可以被发现,通过突变来制造,或者通过重组方法被设计得到。使用本发明方法产生的可发酵糖的任何生物催化剂都可以用来制备已知能够通过本发明方法的发酵而产生的目标化学品。

[0070] 通过产生溶剂的(solventogenic)梭菌将碳水化合物发酵成丙酮、丁醇和乙醇(ABE发酵)是公知的(Jones和Woods(1986)Microbiol. Rev. 50:484-524)。使用丙酮丁醇梭杆菌(*Clostridium acetobutylicum*)的突变株产生高水平的丁醇,同时产生丙酮和乙醇的发酵方法描述于US5192673中。拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)突变株产生高水平的丁醇,同时产生丙酮和乙醇的用途描述于US 6358717中。大肠杆菌的遗传修饰株也已经用作乙醇生产的生物催化剂(Underwood等人,(2002)Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272)。改善了乙醇生产的运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)遗传修饰株描述于US2003/0162271 A1中。

[0071] 乳酸已经在大肠杆菌(*E. coli*)的重组体(Zhou等人,(2003)Appl. Environ. Microbiol. 69:399-407),芽孢杆菌(*Bacillus*)的天然株(US20050250192),和米根霉(*Rhizopus oryzae*)(Tay和Yang(2002)Biotechnol. Bioeng. 80:1-12)的发酵中被制备。大肠杆菌(*E. coli*)的重组体已经用作发酵中的生物催化剂以产生1,3-丙二醇(US6013494, US 6514733),和己二酸(Niu等人,(2002)Biotechnol. Prog. 18:201-211)。乙酸已经通过使用梭菌(*Clostridia*)重组体(Cheryan等人,(1997)Adv. Appl. Microbiol. 43:1-33)和新鉴定的酵母株(Freer(2002)World J. Microbiol. Biotechnol. 18:271-275)的发酵而得到制备。通过大肠杆菌(*E. coli*)重组体和其它细菌的琥珀酸的制备公开于US 6159738中,而通过大肠杆菌(*E. coli*)重组体突变株的制备公开于Lin等人的(2005)Metab, 英语7:116-127)中。丙酮酸已经通过光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata* yeast)的突变株(Li等人,(2001)Appl. Microbiol. Technol. 55:680-685)以及通过大肠杆菌(*E. coli*)的突变株(Yokota等人,(1994)Biosci. Biotech. Biochem. 58:2164-2167)而得到制备。大

肠杆菌 (*E. coli*) 的重组体已经被用作产生对 - 羟基肉桂酸 (US20030170834) 和奎尼酸 (US20060003429) 的生物催化剂。

[0072] 已经将疮疱丙酸杆菌 (*Propionibacterium actidipropionici*) 的突变株用于发酵以产生丙酸 (Suwannakham 和 Yang(2005) *Biotechnol. Bioeng.* 91 :325-337), 丁酸已经通过酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum*) (Wu 和 Yang(2003) *Biotechnol. Bioeng.* 82 :93-102) 而得到制备。丙酸酯和丙醇已经由苏氨酸通过梭菌 (*Clostridium* sp.) 菌株 17cr1 经发酵而得到制备 (Janssen(2004) *Arch. Microbiol.* 182 :482-486)。似酵母的出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 已经被用于制备葡糖酸 (Anantassiadis 等人, (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 91 :494-501), 通过 *Aspergillus niger* 的突变株 (Singh 等人, (2001) *Indian J. Exp. Biol.* 39 :1136-43)。5- 氧代 -D- 葡萄糖是通过氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 的突变株制备的 (Elfari 等人, (2005) *Appl Microbiol. Biotech.* 66 :668-674), 衣康酸是通过土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的突变株制备的 (Reddy 和 Singh(2002) *Bioresour. Technol.* 85 :69-71), 柠檬酸是通过黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 株的突变株制备的 (Ikram-Ul-Haq 等人, (2005) *Bioresour. Technol.* 96 :645-648), 木糖醇是通过季也蒙氏假丝酵母 (*Candida guilliermondii*) FTI 20037 制备的 (Mussatto 和 Roberto(2003) *J. Appl. Microbiol.* 95 :331-337)。含有 4- 羟基戊酸酯, 还含有显著量的 3- 羟基丁酸、3- 羟基戊酸的生物聚酯是由恶臭极毛杆菌 (*Pseudomonas putida*) 和 *Ralstonia eutropha* 的重组体制备的 (Gorenflo 等人, (2001) *Biomacromolecules* 2 :45-57)。L-2,3- 丁二醇是由大肠杆菌 (*E. coli*) 的重组体制备的 (Ui 等人, (2004) *Lett. Appl. Microbiol.* 39 :533-537)。

[0073] 已经实现了通过发酵来制备氨基酸, 制备中使用了棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*) 和沙雷菌属 (*Serratia*) 的营养缺陷型菌株和氨基酸类似物 - 抗性株 (amino acid analog-resistant strains)。例如, 使用耐组氨酸类似物株制备组氨酸描述于日本专利公开 No. 8596/81 中, 使用重组株的描述于 EP 136359 中。使用耐色氨酸类似物株制备色氨酸描述于日本专利公开 Nos. 4505/72 和 1937/76 中。使用耐异亮氨酸类似物株制备异亮氨酸描述于日本专利公开 Nos. 38995/72, 6237/76, 32070/79 中。使用耐苯丙氨酸类似物株制备苯丙氨酸描述于日本专利公开 No. 10035/81 中。使用生长需要苯丙氨酸而耐酪氨酸的菌株 (*Agr. Chem. Soc. Japan* 50(1) R79-R87(1976)), 或者重组株 (EP263515, EP332234) 制备酪氨酸, 以及使用耐 L- 精氨酸类似物株制备精氨酸 (*Agr. Biol. Chem.* (1972) 36 :1675-1684, 日本专利公开 Nos. 37235/79 和 150381/82) 已经被描述。苯丙氨酸也可以通过在大肠菌 (*Escherichia coli*) 株 ATCC 31882, 31883 和 31884 中的发酵而制备。在重组棒杆菌中制备谷氨酸描述于 US 6962805 中。通过大肠杆菌 (*E. coli*) 的突变株制备苏氨酸描述于 Okamoto 和 Ikeda(2000) *J. Biosci Bioeng.* 89 :87-79 中。甲硫氨酸是通过百合棒状杆菌 (*Corynebacterium lilium*) 的突变株制备的 (Kumar 等人, (2005) *Bioresour. Technol.* 96 :287-294)。

[0074] 有用的肽、酶和其它蛋白质也已经通过生物催化剂得到了制备 (例如, 在 US6861237, US6777207, US6228630 中)。

[0075] 由生物质到可发酵糖的预处理和糖化, 接着由糖到目标化学品的发酵在本文的实施例 9 中得到了举例性的说明, 所述实施例 9 是为了使用运动发酵单胞菌 (*Z. mobilis*) 作

为由糖到乙醇的发酵的生物催化剂,由预处理过的玉米芯制备乙醇。本发明的方法也可以用于由生物质制备 1,3- 丙二醇。生物质经过根据本发明的预处理和糖化;糖化后(或糖化期间),使用大肠杆菌(E. coli)按照本文实施例 10 所描述的方法来制备 1,3- 丙二醇。

[0076] 通过生物催化剂在发酵中制备的目标化学品可以使用多种本领域已知的方法进行回收。产品可以通过离心、过滤、微过滤和纳滤与其它发酵组分分离。产品可以通过离子交换、溶剂萃取或电渗析而得到萃取。絮凝剂可以用来帮助产品的分离。作为一个具体的例子,生物制备的 1- 丁醇可以使用本领域公知的用于 ABE 发酵的方法(例如参见, Durre, Appl. Microbial. Biotechnol. 49 :639-648(1998), Groot 等 人, Process. Biochem. 27 : 61-75(1992) 以及它们的参考文献)从发酵培养基中分离出来。例如,固体可以通过离心、过滤或倾析等从发酵培养基中被除去。接着,使用例如蒸馏、共沸蒸馏、液-液萃取、吸附、气提、薄膜蒸发或全蒸发的方法从发酵培养基中分离出 1- 丁醇。来自发酵培养基的 1,3- 丙二醇的纯化可以通过,例如,使反应混合物进行有机溶剂萃取、蒸馏和柱色谱(U. S. 5, 356, 812) 而完成。用于该方法的特别优良的有机溶剂是环己烷(U. S. 5, 008, 473)。氨基酸可以通过例如离子交换树脂吸附和/或结晶的方法从发酵培养基中得到收集。

[0077] 实施例

[0078] 通用方法和材料

[0079] 使用如下缩写:

[0080] “HPLC”是高效液相色谱,“C”是摄氏度,“kPa”是千帕斯卡,“m”是米,“mm”是毫米,“kW”是千瓦,“ μm ”是微米,“ μL ”是微升,“mL”是毫升,“L”是升,“min”是分钟,“mM”是毫摩尔,“cm”是厘米,“g”是克,“kg”是千克,“wt”是重量,“hr”是小时,“temp”或“T”是温度,“theoret”是理论上的,“pretreat”是预处理,“DWB”是生物质干重。

[0081] 硫酸、氢氧化铵、乙酸、乙酰胺、酵母提取物、2- 吗啉乙基磺酸(MES)、磷酸钾、葡萄糖、木糖、胰化蛋白胨、氯化钠和柠檬酸由 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO) 获得。

[0082] 预处理反应器

[0083] Zipperclave[®] 反应器

[0084] 4- 升的 Zipperclave[®] 反应器(Autoclave Engineers, Erie, PA) 是一种间歇式压力容器,其装有用于生物质装料的 2.5 升 Hastelloy[®] 桶和用于混合生物质的搅拌器。反应容器由控制在期望预处理温度下的电热器所围绕。还能够使用直接蒸汽注入将生物质快速加热到预处理温度。调节并控制蒸汽压力以保持期望的预处理温度。由加热 Zipperclave[®] 反应器的顶盘、容器和桶的外部而形成的蒸汽冷凝水被引流到在桶和反应器内壁之间形成的贮水池中,以防止预处理浆料的过渡稀释。

[0085] Jaygo 反应器

[0086] Jaygo 反应器是由 Hastelloy[®] C-22 合金制造的 130 升(大约为 51cm 直径×91cm 长度)卧式桨型反应器(Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ)。该反应器安装有能够加热到大约 177°C (862kPa) 的蒸汽夹套。还能够使用直接蒸汽注入将生物质快速加热到预处理温度。调节并控制蒸汽压力以保持期望的预处理温度。多个入口允许其它溶剂和热液体的注入。

[0087] 蒸汽枪反应器间歇消化系统

[0088] 4-升蒸汽枪反应器 (Autoclave Engineers, Erie, PA) 是由 102mm 长的表 80 (schedule 80) Hastelloy[®] 管组成的蒸汽-夹套反应器, 所述管由两个球阀闭合。附加电热器设置在反应器所有暴露的、非夹套表面上并被控制到预处理所设定的温度点。还使用直接蒸汽注入将生物质快速加热到预处理温度。调节并控制蒸汽压力以保持期望的预处理温度。反应器的底部向下收缩至 51mm。所有预处理材料均通过反应器底部的一个可替换模口排出并且被收集在一个尼龙的 (Hotfill[®]) 0.21m³ 的袋子中, 所述袋子固定于厚壁的、带夹套且冷却的闪蒸罐内部。盘磨机

[0089] 盘磨机是安装有 11kW 电动机的 Sprout Waldron 型 30.5cm 精磨机 (Andritz, Inc., Muncy, PA)。固定盘和转动盘之间的缝隙是可以改变的。送料旋转速度也是可以改变的, 可为 0-88rpm。精磨机的入口被改装为六个注入口, 从而允许刚好在精磨机转盘旋转之前引入蒸汽、热水或其它吹扫气体和液体。精磨机安装有 D2A506 图案的 Ni-Hard 盘或者 18034-A 图案的 Ni-Hard 盘 (Durametal, Corp., Tuiatin, OR)。预处理和酶水解反应器 (PEHR)

[0090] 9L 的 PEH 反应器 (在 NREL, Golden, CO 建造, 参见待审美国专利申请 CL3447) 具有大约 15cm×51cm 的不锈钢反应容器, 该容器具有用于引入待加工反应物的喷射枪。使用旋转接头将所述喷射枪与容器一端上的盖子中的端口相连, 其具有与容器相连通的另外的端口。四个挡板平均分割了容器壁的长度, 并且与所述壁垂直设置。在容器转动时, 挡板和可在容器中自由浮动的二十二个 3.2cm×3.2cm 的陶瓷研磨介质圆筒 (E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) 向生物质和反应物施加了机械混合, 促进了生物质对反应物的吸收作用。PEH 反应器位于为旋转提供了机械装置的 Bellco Cell-Production Roller Apparatus (Bellco Technology, Vineland, NJ) 上, 并且将具有滚筒装置的反应器设置在提供热量的温度控制室内。真空和压力可以通过将外部来源附加到与喷枪连接的盖子中的端口上而被施加到反应容器中。

[0091] 分析方法

[0092] 纤维素的定量

[0093] 各起始生物质样品中的纤维素的量是用本领域公知的方法确定的, 例如 ASTM E1758-01 “通过 HPLC 测定碳水化合物的标准方法 (Standard method for the determination of carbohydrates by HPLC)”。糖、乙酰胺、乳酸和乙酸含量的测定

[0094] 糖化溶液中的可溶性糖 (葡萄糖、纤维二糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露糖)、乙酰胺、乳酸和乙酸是通过 HPLC 测定的, 其中 HPLC 使用的是具有适当保护柱的 Bio-Rad HPX-87P 和 Bio-Rad HPX-87H 柱 (Agilent Model 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)。测定样品的 pH, 并且如果需要, 用硫酸将其调节至 5-6。接着使样品通过 0.2 μm 的针筒式过滤器直接进入 HPLC 瓶。HPLC 操作条件如下:

[0095] Biorad Aminex HPX-87P (用于碳水化合物):

[0096] 注射体积: 10-50 μL, 取决于浓度和检测器的极限

[0097] 流动相: HPLC 级水, 0.2 μm 过滤并脱气

[0098] 流速: 0.6mL/分钟

- [0099] 柱温 :80–85℃, 保护柱的温度 < 60℃
- [0100] 检测器温度 :尽可能地接近主柱的温度
- [0101] 检测器 :折射率
- [0102] 运行时间 :35 分钟的数据收集加 15 分钟的后运行 (对于更迟的洗脱化合物可进行可能的调整)
- [0103] Biorad Aminex HPX-87H(用于碳水化合物、乙酰胺、乳酸、乙酸和乙醇) :
- [0104] 注射体积 :5–10 μ L, 取决于浓度和检测器的极限
- [0105] 流动相 :0.1N 的硫酸, 0.2 μ m 过滤并脱气
- [0106] 流速 :0.6mL/ 分钟
- [0107] 柱温 :55℃
- [0108] 检测器温度 :尽可能地接近柱温
- [0109] 检测器 :折射率
- [0110] 运行时间 :25–75 分钟的数据收集
- [0111] 运行之后, 样品中的浓度由每个化合物的标准曲线确定。

[0112] 实施例 1

[0113] 高生物质浓度、高温和对比氨浓度下的秸秆预处理

[0114] 在引入生物质物料之前, 通过若干次地向反应器中循环入蒸汽并排空, 将 Zipperclave[®] 反应容器和顶板预热到目标预处理温度。在预处理前将预热期间形成的冷凝水通过真空吸引而除去。向 Hastelloy[®] 桶中装入 0.635cm(1/4in.) 的粉碎的秸秆 (100g, 基于干重), 并将桶插入到预热的反应器中。将反应器的搅拌器设置到 20rpm, 同时对容器内部和生物质物料抽真空 (大约 85kPa)。将氢氧化铵溶液在接近容器底部处用喷雾型喷嘴注入, 所述氢氧化铵溶液的浓度是给出相对于生物质-氨水混合物重量 30 重量百分比的生物质干重浓度所需的浓度, 并且期望的氨浓度列于表 1 中。样品的最终氨浓度相对于生物质干重为 12%, 同时使用最终氨浓度相对于生物质干重为 35% 的样品作为对比。当生物质物料的温度达到 50℃ 时, 在接近反应器底部处引入蒸汽以使生物质物料流体化并且将其温度升高到 140℃ 或 170℃。在预处理结束时, 通过通风冷凝器使反应器降压, 在打开反应器和回收预处理生物质之前, 将反应器抽真空 (大约 85kPa) 3 分钟以降低温度并从预处理浆料中除去多余的氨。

[0115] 将含有 0.5g 纤维素 (以初始原料组合物为基础) 的全部的未洗涤预处理浆料加入到最终体积为 50mL 到 125mL 的摇瓶中。由于酶对高 pH 环境敏感, 所以在加入酶之前加入乙酸 (10–100 μ L), 以将氨-预处理生物质的 pH 滴定到 5.0。糖化期间通过加入 50mM 柠檬酸缓冲液将 pH 控制在 5.0, 并且使温度保持在 50℃。向表 1 所列各样品浓度中加入 Spezyme[®] CP 纤维素酶 (Genencor International, Rochester, NY)。在 96hr 的糖化作用后, 根据“常用方法 (GeneralMethod)”中所描述的糖测定规程确定所产生的糖化溶液的含糖量。96hr 后释放的糖显示于表 2 中。该试验的对照组是 1) 未处理的玉米秸, 其产生理论产率为 23% 的葡萄糖 (使用 56mg 纤维素酶 /g 纤维素) 和 2) 蒸汽 (140℃) 预处理的玉米秸, 其产生理论产率为 40% 的葡萄糖 (使用 56mg 纤维素酶 /g 纤维素); 没有测定对照组的木糖。

[0116] 表 1 :糖化 96hr 后由预处理玉米秸所释放的糖

[0117] DWB :生物质干重

[0118]

氨 (g/100 g DWB)	预处理温度 (°C)	预处理 时间	纤维素酶 (mg/g 纤维素)	葡萄糖释放 (% 理论值)	木糖释放 (% 理论值)
35	170	5 min	56	68.0	60.0
12	170	5 min	56	58.5	45.3
12	170	5 min	11	40.8	27.1
35	140	5 min	56	54.5	41.5
12	140	5 min	56	53.0	31.4
12	140	5 min	11	38.9	17.1
12	140	15 min	56	62.4	49.6
12	140	15 min	11	41.7	33.6

[0119] 这些结果表明使用 12% 的氨在 140°C 下预处理 15 分钟,接着进行糖化所释放的葡萄糖和木糖比使用 35% 的氨在 140°C 下预处理 5 分钟时的更多。因此,使用较低浓度氨的优点可以与预处理时间的微小增加相结合。

[0120] 实施例 2

[0121] 高生物质浓度、低温和极低氨浓度下的秸秆预处理

[0122] 向 Jaygo 反应器中装料入 0.635cm 粉碎的秸秆 (13kg, 基于干重)。对容器抽真空 (67.7kPa), 并且注入稀氢氧化铵溶液, 以提供 6.2g 氨 /100g 生物质干重的氨浓度以及相对于生物质 - 氨水混合物总重 30 重量百分比的生物质干重浓度。降低真空度, 向夹套中施加蒸汽以将秸秆加热到 100°C。将浸湿的秸秆在 32rpm 的持续搅拌下保温 8hr, 然后将所产生的浆料冷却过夜, 期间继续搅拌。

[0123] 将含有 0.5g 纤维素 (以初始原料组合物为基础) 的全部的未洗涤预处理浆料加入最终体积为 50mL 到 125mL 的摇瓶中。由于酶对高 pH 环境敏感, 所以在加入酶之前加入乙酸 (10-100 μ L), 以将氨 - 预处理生物质的 pH 滴定到 5.0。糖化期间通过加入 50mM 柠檬酸缓冲液将 pH 控制在 5.0, 并且使温度保持在 50°C。加入 Spezyme[®] CP 纤维素酶 (Genencor International, Rochester, NY) 以达到 56mg/g 纤维素。在 96 小时的糖化作用后, 根据“常用方法 (General Method)”中所描述的糖测定规程确定所产生的糖化溶液的含糖量, 并且将其示于表 2 中。

[0124] 表 2 :96 小时后由预处理的玉米秸所释放的糖

[0125]

氨 (g/100 g DWB)	预处理温度 (°C)	预处理 时间	纤维素酶 (mg/g 纤维素)	葡萄糖释放 (%理论值)	木糖释放 (%理论值)
6.2	100	8 小时	56	63.9	44.8

[0126] 结果表明这些极低的氨浓度和低温预处理条件, (预处理时间为 8hr) 与 140°C 下使用 12% 的氨进行 15 分钟一样有效。

[0127] 实施例 3

[0128] 高生物质浓度、低温和极低氨浓度下的玉米芯预处理, 以及随后的高生物质浓度的糖化

[0129] 将完整的或者粉碎的玉米芯 (大约 13kg, 基于干重) 装入到 Jaygo 反应器中。玉米芯是通过装有 C-2975 盘的盘磨机 (“常用方法 (GeneralMethod)”) 粉碎的。将所产生的粉碎的玉米芯过 1.27cm 筛。使留下的全部碎片再次通过具有 0.5cm 的较小缝隙的盘磨机。将反应器抽真空, 并注入稀氢氧化铵溶液以提供最终期望的氨浓度 (2% 或 6%) 和干生物质浓度 (30% 或 40%), 如表 3 中所给出的。降低真空度并向夹套内施加蒸汽以加热玉米芯, 同时在 93°C 的温度下浸泡完整的玉米芯样品, 在 85°C 的温度下浸泡粉碎的玉米芯样品。为了增加加热速度, 可以在短时间内增加搅拌器的速度 (直至 96rpm)。将浸湿的玉米芯在 32rpm 的持续搅拌下保温 4 或 8 小时, 接着将其冷却过夜, 期间继续搅拌。

[0130] 在从反应器中移出预处理生物质之前, 将反应器在 90°C 下抽真空以从预处理生物质中解吸出氨。糖化前, 用固体柠檬酸将预处理玉米芯生物质的 pH 调节到 5.5。50°C 下在 Jaygo 反应器中对约 10kg 预处理过的完整玉米芯进行糖化。向 PEH 反应器中加入约 1400g 预处理过的粉碎玉米芯和 22 个陶瓷研磨圆筒 (3.2cm 直径 × 3.2 长; E. R. Advanced Ceramic, East Palestine, OH) 用于糖化。每个糖化反应都使用了 28mg Spezyme CP[®] /g 未处理秸秆中的纤维素与 28mg/g 纤维素的 Multifect Xylanase[®] 的酶混合物。每个糖化作用开始时的生物质最终干重浓度相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物的总重均为 30%。PEH 反应器以 19rpm 的速度轴向旋转, 同时保持温度在 50°C。所产生糖化溶液的含糖量是根据 “常用方法 (General Methods)” 中的糖测定规程确定的。96hr 后释放的糖显示于表 3 中。

[0131] 表 3: 糖化期间使用高浓度的生物质 (干重) 时

[0132] 由预处理过的玉米芯所释放的糖

[0133] DWB: 生物质的干重 (相对于混合物总重量计算的百分比)

[0134]

原料	预处理 时间 (hr)	预处理 温度 (°C)	氨 (g/100 g DWB)	DWB (预处理)	DWB (糖化)	葡萄糖释放 (% 理论值)	木糖释放 (% 理论值)
完整的 玉米芯	8 hr	93	6	40 %	30 %	54.4	46.1
粉碎的 玉米芯	4 hr	85	2	30 %	30 %	42.1	19.1

[0135] 实施例 4

[0136] 高生物质浓度、高温和极低氨浓度下的玉米芯预处理,以及随后的高生物质浓度的糖化

[0137] 将粉碎的玉米芯 (13kg, 干重) 装入 Jaygo 反应器中。将反应器抽真空后, 在室温下向 32rpm 搅拌的反应器中倾注入适当浓度的氢氧化铵溶液, 所述浓度能够提供 2% 的氨和 30% 的生物质干重浓度。接着使用低压夹套蒸汽将反应器中所含物质加热到 95°C。反应器一达到 95°C, 就用直接蒸汽注入将反应器中所含物质加热到 145°C。当反应器达到 145°C 时, 将反应器中所含物质用夹套蒸汽和一些直接注入蒸汽保温 20 分钟。20 分钟后, 在通风孔上对反应器抽真空并且开动粉碎机发动机 5 分钟。1 小时后向夹套中供入冷却水。讲 Jaygo 反应器中所含物质冷却至 33°C 到 37°C 之间; 接着用 CO₂ 将反应器加压到 138kPa。使加压的 CO₂ 环境保持 30min。反应器所含物质的最终温度在 27°C 到 31°C 之间。浸湿 / 预处理生物质的 pH 为大约 7.5。

[0138] 将预处理生物质从 Jaygo 反应器中移出并转移到用于糖化的 PEH 反应器中, 糖化开始时最终生物质干重浓度相对于预处理 - 糖化酶聚生体混合物的总重为 30%。接着用固体柠檬酸将 pH 调节到 5.5, 将材料用 28mg Spezyme CP[®] /g 纤维素和 28mg Multifect Xylanase[®] /g 纤维素在如实施例 3 所描述的未处理玉米芯中进行消化。所产生糖化溶液的含糖量根据“常用方法 (General Methods)”中的糖测定规程确定。96 小时后所释放的糖显示于表 4 中。

[0139] 表 4: 糖化期间使用高浓度的生物质 (干重) 时

[0140] 由预处理过的玉米芯所释放的糖。

[0141]

原料	预处理 时间 (hr)	预处理 温度 (°C)	氨 (g/100 g DWB)	DWB (预处理)	DWB (糖 化)	葡萄糖释放 (% 理论值)	木糖释放 (% 理论值)
粉碎的 玉米芯	20 分钟	145	2	30 %	30 %	35.9	45.4

[0142] 实施例 5

[0143] 加入增塑剂的预处理

[0144] 将完整的玉米芯如实施例 3 中所描述的那样进行预处理,其生物质干重浓度相对于生物质-氨水混合物总重量为约 30%,氨相对于生物质干重为 2 重量百分比,温度为 100℃,在 Jaygo 反应器中进行 8 小时,反应器中加入有相对于生物质干重 3 重量百分比的甘油作为增塑剂。预处理后,用固体柠檬酸将所产生材料的 pH 调节到 5。接着如实施例 3 中所描述那样对预处理过的玉米芯进行消化。使用 28mgSpezyme CP[®]/g 未处理秸秆中纤维素与 28mg Multifect Xylanase[®]/g 未处理玉米芯中纤维素的酶混合物。在 96 小时的消化之后,葡萄糖的浓度为 92.3g/L,木糖的浓度为 54.4g/L。

[0145] 实施例 6

[0146] 预处理生物质的盘磨

[0147] 以实施例 1 中描述的方式对秸秆进行预处理,其中使用具有低氨浓度(12%)或用于比较的氨浓度(35%)的不同样品,而温度、时间和酶条件如表 5 中所列。将完整的玉米芯如实施例 3 所描述那样进行预处理,其中使用具有极低氨(3%或6%)的不同样品,其它条件如表 5 中所列。预处理后,使样品通过 Sprout Waldron 盘磨机。将固定盘与转动盘之间的缝隙设置在 0.245mm(0.010 英寸),送料旋转速度为 7rpm。将精磨后的材料按照实施例 2 中描述的方法进行糖化,所产生糖化溶液的含糖量根据“常用方法(General Methods)”中的糖测定规程而确定。96 小时后的糖化作用结果显示于表 5 中。该结果表明在糖化之前进行盘磨能够获得较好的可消化性,或者使用较低的酶浓度是有效的。

[0148] 表 5:糖化前被盘磨过的预处理材料的可消化性

[0149]

原料	预处理 时间	预处理 温度 (°C)	氨 (g/100 g DWB)	纤维素 (mg/g 纤维素)	加入的 纤维素酶 (mg/g 纤维素)	葡萄糖 释放 (% 理论值)	木糖 释放 (% 理论值)
秸秆	5 min	170	35	56	0	87.3	72.5
秸秆	5 min	140	35	56	0	76.9	59.4
秸秆	5 min	170	12	56	0	58.8	39.9
秸秆	5 min	170	12	28	28	68.4	62.3
秸秆	5 min	140	12	56	0	69.1	48.6
秸秆	5 min	140	12	11	0	52.6	31.5
秸秆	15 min	140	12	56	0	61.8	40.1
秸秆	15 min	140	12	28	28	66.7	54.1
秸秆	8 hr	100	6	56	0	79.9	59.6
玉米芯	8 hr	93	6	56	0	82.4	51.7
玉米芯	8 hr	93	6	28	28	83.1	58.6
玉米芯	8 hr	100	2	56	0	68.0	38.5
玉米芯	8 hr	100	2	28	28	81.0	57.3

[0150] 实施例 7

[0151] 预处理生物质的蒸汽枪处理

[0152] 如实施例 1 所描述的使用如下条件对秸秆进行预处理,所述条件为相对于生物质-氨水混合物总重量 30% 的生物质干重,相对于 DWB6 重量百分比的氨,100℃,在 Jaygo 反应器中进行 8 小时。如实施例 3 所描述的使用如下条件对玉米芯进行预处理,所述条件为相对于生物质-氨水混合物总重量的 40% 的生物质干重,相对于 DWB 的 6 重量百分比的氨,93℃,在 Jaygo 反应器中进行 8 小时。将每种预处理生物质样品分别装入 4- 升的蒸汽枪反应器中。使预处理过的材料在 170℃ 经受 5 分钟,或者在 140℃ 经受 20 分钟,然后将其通过端口放出。将所产生的材料如实施例 2 所描述的进行糖化。结果在下表 6 中给出。所述结果显示糖化前的蒸汽枪处理改善了葡萄糖的释放。

[0153] 表 6 :蒸汽枪处理过的预处理过材料的可消化性

[0154]

原料	蒸汽枪 温度 (°C)	蒸汽枪 时间 (min)	纤维素酶 (mg/g 纤维素)	加入的 纤维素酶 (mg/g 纤维素)	葡萄糖释放 (% 理论值)	木糖释放 (% 理论值)
秸秆	170	5	56	0	77.5	37.5
秸秆	170	5	28	28	82.5	64.4
秸秆	140	20	56	0	73.4	43.4
秸秆	140	20	28	28	82.2	66.9
玉米芯	170	5	28	28	70.7	47.4
玉米芯	170	5	11	11	49.1	38.9
玉米芯	140	20	28	28	55.7	39.0
玉米芯	140	20	11	11	32.9	24.0

[0155] 实施例 8

[0156] 具有氨再循环的预处理模型

[0157] 针对两个预处理方案：低温（85℃）、长停留时间（4 小时）和高温（130℃）、短停留时间（20 分钟），用 Aspen 模型（Aspen Technologies, Cambridg, MA, version 12.1）检验氨再循环的优点。每个模型都在预处理反应器后具有三个串联的闪蒸罐以提供进行氨再循环的装置，所述串联的闪蒸罐是在顺序降低的压力下操作的。随着原料流进入各个罐，由于压力的降低其被分成蒸汽部分和液体部分。将蒸汽部分再循环入预处理步骤，而液体部分进入方法中的下一个步骤。假设预处理步骤中氨相对于 DWB 为 2 重量百分比并且生物质的干重相对于生物质-氨水混合物总重为大约 27%，则新供给的氨和来自每个步骤的再循环流的氨显示于表 7 中。在两个模型中，闪蒸罐以相似的方式操作，以便氨的循环也相似。对于两个方案来说，超过一半的所需要的氨是通过再循环供给的，这减少了对新鲜氨的需求和费用。

[0158] 表 7：预处理-Aspen 模型结果中的氨再循环

[0159]

	高 T/短停留时间		低 T/长停留时间	
	预处理中氨的流速 (kg/hr)	预处理中氨的总分数	预处理中氨的流速 (kg/hr)	预处理中氨的总分数
新鲜 NH ₃	518.6	43.5%	520.2	43.7%
来自第 1 闪蒸罐	371.2	31.2%	374.4	31.4%
来自第 2 闪蒸罐	137.2	11.5%	135.4	11.4%
来自第 3 闪蒸罐	164.1	13.8%	161.2	13.5%
总计	1191.2	100%	1191.2	100%

[0160] 实施例 9

[0161] 由低浓度氨 - 预处理并糖化的玉米芯生物质制备乙醇, 以及与高浓度氨 - 预处理和糖化的秸秆的比较

[0162] 玉米芯水解产物是通过如实施例 3 所描述的对完整的玉米芯进行预处理而产生的, 其中所述预处理用相对于生物质干重 6 重量百分比的氨以相对于生物质 - 氨混合物总重量 40 重量百分比的生物质干重浓度在 Jaygo 反应器中在 93°C 下进行 8 小时。预处理后, 通过在真空下将反应器加热到 90°C 将氨除去。然后用硫酸将预处理生物质的 pH 调节到 5。预处理生物质的糖化是在 Jaygo 反应器中在相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物总重量 30% 的生物质干重下用 28mg/g 纤维素的 Spezyme[®] 纤维素酶和 28mg/g 纤维素的 Multifect Xylanase[®] 在 50°C 和 pH5 下进行 168 小时而实现的。将所产生的水解产物用于运动发酵单胞菌 8b (*Zymomonas mobilis* 8b) 在 Sixfors 发酵罐 (INFORS AG, Switzerland) 中的发酵。运动发酵单胞菌 8b 是一种基因工程设计的运动发酵单细胞菌株, 相对于天然类型的菌株其给出了改善的乙醇产率, 该菌株被描述于美国专利申请公开 2003/0162271 A1 (实施例 IV、VI 和 XII) 中。玉米水解产物包含 78g/L 的葡萄糖、51g/L 的木糖、6g/L 的乙酰胺和 7g/L 的乙酸。玉米芯水解产物以 40% 和 80% 的浓度使用, 培养基的其余部分为由酵母提取物和 KH₂PO₄ 组成的浓缩的水培养基, 其中酵母提取物和 KH₂PO₄ 的量能够使最终浆料中二者的浓度分别为约 5g/L 和 2g/L。此外, 在 40% 的水解产物浆料中加入足够量的葡萄糖和木糖以使它们的浓度能够达到与 80% 水解浆料中相同的水平。发酵在 37°C 下进行。发酵罐中的搅拌为 100rpm, 通过加入 2N 的 KOH 将 pH 维持在 5.5。结果显示于表 8 中。如“常用方法 (General Methods)”中所描述的对糖和乙醇进行分析。

[0163] 为了对比, 通过如实施例 1 所描述的秸秆预处理来产生秸秆水解产物, 其中所述预处理用相对于生物质干重 35 重量百分比的氨以相对于生物质 - 氨水混合物总重量约 30 重量百分比的生物质干重浓度在 170°C 在 Zipperclave[®] 反应器中进行 5min。预处理生物质在相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物总重 30% 的生物质干重下用 224mg/g 纤维

素的 Spezyme CP[®] 纤维素酶在 50℃ 和 pH5 下进行酶消化,以产生用于发酵试验的高糖浓度水解产物。所产生的水解产物包含 88g/L 的葡萄糖、52g/L 的木糖、9g/L 的乙酸和 15g/L 的乳酸。为了制备乙醇,将运动发酵单胞菌 8b (*Zymomonas mobilis* 8b) 在 40% 或 80% (v/v) 的水解产物浆料上进行发酵。剩余体积由浓缩的水培养基组成,所述水培养基由酵母提取物、KH₂PO₄ 和 MES 缓冲液组成,它们的量能够使其在最终浆料中的浓度分别为 10g/L、2g/L 和 0.1M。此外,在 40% 的水解产物浆料中,加入足够量的葡萄糖和木糖以使它们的浓度达到与 80% 水解浆料中的相同的水平。发酵在 30℃ 和 pH6 的条件下在有效溶剂为 20ml 的 25ml 摇瓶中进行。搅拌保持在 150rpm。根据玉米芯水解产物发酵样品的分析方法进行分析,结果在表 8 中给出。

[0164] 表 8:在玉米芯和秸秆水解产物的发酵中糖的利用率和乙醇的产率

[0165]

	秸秆 (120 hr 的终点)		玉米芯 (72 hr 的终点)	
	40 % 的水解产物	80 % 的水解产物	40 % 的水解产物	80 % 的水解产物
利用的葡萄糖	100 %	97 %	99 %	97 %
利用的木糖	90 %	16 %	96 %	57 %
乙醇产率	77 %	53 %	98 %	87 %

[0166] 这些结果显示从用低浓度氨预处理过的玉米芯水解产物中制备乙醇的发酵比从用高浓度氨预处理过的秸秆中的效率更高。

[0167] 实施例 10

[0168] 由极低浓度氨 - 预处理并糖化的玉米芯生物质制备 1,3 丙二醇

[0169] 将由玉米芯的预处理和糖化而产生的水解产物进行发酵以制备 1,3- 丙二醇。水解产物是通过在蒸汽枪反应器中对玉米芯碎片进行预处理而产生的。首先将玉米芯生物质装入 PEH 反应器中 (描述于“常用方法 (General Methods)”中),抽真空,并注入稀氢氧化铵溶液以给出 4g 氨 /100g 生物质干重的氨浓度和 30g 生物质干重 /100g 总生物质 - 氨水混合物的生物质干重浓度。将装有氨和玉米芯的反应容器在 4℃ 下旋转 30min。将所含物质转移到蒸汽枪反应器 (描述于“常用方法 (General Methods)”中) 中,使温度升高到 145℃,将混合物在该温度下保温 20 分钟。将来自蒸汽枪的材料注入到闪蒸罐中,在闪蒸罐上保持真空以帮助除去氨。调节 pH 后,预处理生物质在 30g 生物质干重 /100g 预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物下用 28.4mg/g 纤维素的 Spezyme CP[®] 纤维素酶和 10.1mg 活性蛋白质 /g 由 β - 葡萄糖苷酶、木聚糖酶、β - 木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖酶组成的纤维素酶聚生体在 50℃ 和 pH5.5 下进行 72hr。所产生的水解产物用作通过重组大肠杆菌 (*E. coli*) 株 RJ8n pBE-93 k1 转化为 1,3- 丙二醇的发酵糖源。RJ8npBE-93k1 菌株的结构详细描述于 PCT 申请 WO/2004/018645 (实施例 7) 中,其是 RJ8n 菌株的衍生物,后者描述于 US 6358716 中。水解产物以 10% 的浓度使用,其余为由 7.5g/L KH₂PO₄、2.0g/L 柠檬酸 *H₂O、4.0ml/L 28% NH₄OH、3.0g/L (NH₄)₂SO₄、2.0g/L MgSO₄*7H₂O、0.2g/L CaCl₂*2H₂O、0.33g/L 柠檬酸铁铵、0.5g/L 酵母

提取物、0.1mg/L 维生素 B₁₂、1.0mg/L FeSO₄*7H₂O、1mg/L ZnSO₄*7H₂O、0.1g/L CuSO₄*5H₂O、1mg/L CoCl₂*6H₂O、0.3mg/L MnSO₄*7H₂O、0.1g/L H₃BO₃、0.10g/L NaMoO₄*2H₂O、10mg/L NaCl 所组成的水培养基,并且将最终的 pH 调节到 6.8。培养从 50mL 培养基中的冷冻原料(15%甘油作为防冻剂)开始,其中培养基是在 250mL 挡板烧瓶(baffled flask)中的。将培养基在 34℃以及 300rpm 的摇动下温育 24 小时。所产生的 1,3-丙二醇的量通过如下条件下的 HPLC 来测定:

[0170] 柱子:Showdex SH1011

[0171] 样品体积:20 μL

[0172] 流动相:0.01N H₂SO₄

[0173] 柱温 50℃

[0174] 检测器:Waters 996 光电二极管阵列

[0175] 检测器温度:40℃

[0176] 运行时间:40min

[0177] 结果显示于下表 9 中。通过大肠杆菌 RJ8n pBE-93k1 菌株由葡萄糖发酵所得到的产物包括甘油(中间代谢物)和 1,3-丙二醇。实验在两个相同的烧瓶中进行 24 小时。在该系统中,水解产物中的葡萄糖转化成甘油和 1,3-丙二醇二者。

[0178] 表 9:大肠杆菌发酵的底物利用率和产物的构成

[0179]

	零点时间下的肉汤	烧瓶 1, 24 hr	烧瓶 2, 24 hr
葡萄糖 (g/L)	7.39	2.12	2.10
甘油 (g/L)	0	3.14	3.14
1,3-丙二醇 (g/L)	0	1.03	1.07
葡萄糖利用率	0	71%	72%

[0180] 实施例 11

[0181] 预处理期间乙酰胺的形成

[0182] 对来源于根据实施例 3 和实施例 4 中所描述方法预处理的玉米芯的样品进行分析以确定生物质中乙酰基团的含量。如下测定预处理溶液(除去了不溶性固体的预处理混合物)的乙酸和乙酰胺含量。用 H₂SO₄(72%) 将每个样品的 pH 调节到约 3。为了测定乙酰胺,将样品通过 0.2 μm 的过滤器并按照下列条件进行 HPLC 分析。为了测定总的乙酸根(包括以乙酸和乙酰胺形式存在的乙酸根),将酸化的样品在 121℃下高压反应 1hr;在该步骤过程中,乙酰胺定量地转化为乙酸。高压反应后,使样品冷却。然后将样品通过 0.2 μm 的过滤器进入样品瓶并按下列条件进行分析。

[0183] 乙酸和乙酰胺的浓度由各自所产生的标准曲线确定。

[0184] 流动相:0.01N H₂SO₄, 0.2 μm 过滤并脱气

[0185] 流速:0.6mL/min

[0186] 柱温:55-65℃

[0187] 检测器温度:尽可能地接近柱温

[0188] 检测器:折射率

[0189] 运行时间:60min

[0190] 柱子:具有相应保护柱的 Biorad Aminex HPX-87H 柱

[0191] 对 3 种不同预处理条件的试验结果显示于表 10 中。在每种情况中,所有的乙酰基团均被溶解成乙酸或乙酰胺。

[0192] 表 10. 预处理期间生物质中的乙酰基团向乙酰胺的转化率 DWB, 生物质干重。(相对于生物质-氨水混合物总重量计算的百分比)

[0193]

原料	预处理 时间 (hr)	预处理 温度 (°C)	氨 (g/100 g DWB)	DWB (预处理)	溶液中回收 的初始乙酰 基分数	作为乙酰胺 回收的乙酰 基分数	作为乙酸 回收的乙 酰基分数
完整的 玉米芯	8 hr	93	6	40 %	100 %	44 %	56 %
粉碎的 玉米芯	4 hr	85	2	30 %	90 %	10 %	90 %
粉碎的 玉米芯	20 min	145	2	30 %	99 %	9 %	91 %

[0194] 使用 6% 的氨浓度,接近一半的乙酰基团被转化成乙酰胺,如实施例 12 所示,其对生物催化剂的生长是非抑制性的。

[0195] 实施例 12

[0196] 乙酰胺和乙酸对单细胞发酵菌 (*Zymomonas*) 生长的影响

[0197] 为了测试乙酰胺和乙酸的毒性,使运动发酵单胞菌 (*Z. mobilis*) 株 8b (描述于实施例 9 中) 在 pH 为 6.0、具有或不具有乙酰胺或乙酸的发酵培养基中生长。发酵培养基由 10g/L 酵母提取物、2g/LKH₂PO₄、70g/L 葡萄糖、40g/L 木糖和 0.1M EMS 缓冲液组成。使运动发酵单胞菌株 8b 在 25-mL 挡板 Erlenmeyer 摇瓶中,在无添加物的培养基(对照)、添加了 6g/L 乙酰胺的培养基或添加了 7.2g/L 乙酸的培养基中生长,所述摇瓶处于 30°C 下并以 150rpm 的速度旋转。如图 1 所示,乙酰胺的存在对运动发酵单胞菌 (*Z. mobilis*) 的生长速度和最终浓度都没有影响,而乙酸的存在导致了生长速度的降低和较低的细胞产率(通过干的细胞物质测定的)。

[0198] 实施例 13

[0199] 高生物质浓度、高温和极低氨浓度下的甘蔗渣预处理,以及在低和高浓度下的糖化

[0200] 向无研磨介质的 PEH 反应器(描述于“常用方法 (GeneralMethods)”中)中装满 1.27cm 粉碎的甘蔗渣(370g,基于干重)。该甘蔗渣是 NIST Reference Material RM8491,其来自甘蔗克隆 H65-7052,最初是从 Hawaii Sugar Planters Association, Kunia subataion, Oahu, HI 获得的。将其在 Wiley 磨中研磨以穿过 2mm 的筛网,除去细末(+74

目)。通过使外表面与冰旋转接触而将 PEH 反应器冷却到 4℃。将反应容器抽真空,并注入稀氢氧化铵溶液以给出 4g/100g 生物质干重的氨浓度和 45g/100g 总生物质-氨水混合物的生物质干重浓度,所述氢氧化铵溶液是在 4℃的冷藏室中预冷却过的并且通过浸于冰-水浴中的管道输送。将装有氨和甘蔗渣的反应容器通过向旋转的反应容器表面施加冰而冷却到 4℃,并且在 4℃下旋转 30min。此时,将反应器所含物质转移到“常用方法 (General Methods)”中所描述的蒸汽枪反应器中。蒸汽枪反应器中一装入氨-甘蔗渣混合物,就将温度升高到 145℃,将混合物在该温度下保温 20 分钟。在预处理时间要结束时,将甘蔗渣从蒸汽枪反应器排出通过 1-in 的圆形端口进入闪蒸罐。接下来,将预处理过的甘蔗渣样品在摇瓶中进行糖化,而将另一个样品(大约 163g 干重)在 PEH 反应器中进行糖化。摇瓶糖化是在相对于预处理生物质-糖化酶聚生体混合物总重量 5%的生物质干重下进行的,而 PEH 反应器糖化是在相对于预处理生物质-糖化酶聚生体混合物总重量 30%的生物质干重下进行的。温度保持在 50℃。

[0201] 对于 PEH 反应器糖化,向反应容器中加入约 476g(~163g 干重)预处理生物质和 22 个陶瓷研磨圆筒。用固体柠檬酸将 pH 调节到 5.0-5.5。将反应器保存在保温室内,其温度控制在 50℃并且以 19rpm 的转速轴向旋转。也将未预处理的甘蔗渣以相对于预处理生物质-糖化酶聚生体混合物总重量 5%的生物质干重在摇瓶中进行糖化。所有的糖化均使用 28.4mg/g 纤维素的 Spezyme CP[®] 纤维素酶和 28.4mg/g 纤维素的 Multifect[®] 木聚糖酶在 50℃和 pH5.5 下进行 96 小时。在下表 11 中给出的产率是以理论产率的百分比形式给出的释放量。

[0202] 表 11:甘蔗渣预处理和糖化后的产率

[0203]

	未预处理 5 % 糖化	预处理 5 % DWB 糖化	预处理 30 % DWB 糖化
葡萄糖单体	0.5%	16.6%	23.3%
总葡萄糖	ND	ND	36.4%
木糖单体	1.3%	15.6%	17.2%
总木糖	ND	ND	37.4%

[0204] ND:未测

[0205] 结果表明与未预处理的对照组相比,用极低浓度氨对甘蔗渣进行的预处理提供了充分的糖释放,在释放糖方面,在 PEH 反应器中进行高生物质干重浓度下的糖化作用是非常有效的。

[0206] 实施例 14

[0207] 高生物质浓度、高温和极低氨浓度下的北美鹅掌楸 (Yellow Poplar) 锯屑预处理,以及在低和高浓度下的糖化

[0208] 向无研磨介质的 PEH 反应器中装入北美鹅掌楸锯屑 (596g, 基于干重;由 Sawmiller Inc., Haydencille, OH 购买)。将反应容器抽真空,并且注入稀氢氧化铵溶液以

给出 6g/100g 生物质干重的氨浓度和 44g/100g 总生物质 - 氨水混合物的生物质干重浓度。如实施例 13 中所描述的将装有氨和北美鹅掌楸锯屑的反应容器调整到 4℃, 并且在 4℃ 下旋转 30min。此时, 将反应器所含物质转移到蒸汽枪反应器中。蒸汽枪反应器一装入氨 - 鹅掌楸混合物, 就将温度升高到 145℃, 并且在该温度下将混合物保温 20 分钟。在预处理时间结束时, 将北美鹅掌楸锯屑从蒸汽枪反应器排出, 通过 1-in 的圆形端口进入闪蒸罐。接下来将预处理过的北美鹅掌楸锯屑样品如实施例 13 中所描述的那样在摇瓶中进行糖化, 将另一个样品在 PEH 反应器中进行糖化。摇瓶糖化是在相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物总重量 5% 的生物质干重下进行的, 而 PEH 反应器糖化 (使用 ~ 279g 干重的预处理过的锯屑) 是在相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物总重量 30% 的生物质干重下进行的。也将未预处理的北美鹅掌楸锯屑以相对于预处理生物质 - 糖化酶聚生体混合物总重量 5% 的生物质干重在摇瓶中进行糖化。所有的糖化作用均使用 28.4mg/g 纤维素的 Spezyme CP[®] 纤维素酶和 28.4mg/g 纤维素的 Multifect[®] 木聚糖酶在 50℃ 和 pH5.5 下进行 96 小时。在下表 12 中给出的产率是以理论产率百分比的形式给出的释放量或各种糖。

[0209] 表 12 : 北美鹅掌楸锯屑预处理和糖化后的产率

[0210]

组分	未预处理 5 % DWB 糖化	预处理 5 % DWB 糖化	预处理 30 % DWB 糖化
葡萄糖单体	2.7%	11.1%	20.6%
总葡萄糖	ND	ND	30.0%
木糖单体	0%	17.9%	18.9%
总木糖	ND	ND	40.2%

[0211] ND : 未测

[0212] 结果表明与未预处理的对照组相比, 用极低浓度氨对北美鹅掌楸锯屑进行的预处理提供了充分的糖释放, 在释放糖方面, 在 PEH 反应器中进行高生物质干重下的糖化作用比在摇瓶中更加有效。

[0213] 实施例 15

[0214] 通过对来自极低浓度氨预处理并糖化的玉米芯生物质的水解产物进行酵母发酵来制备乙醇

[0215] 实施例 10 中用于制备 1,3- 丙二醇的相同水解产物也可以用于由酵母发酵制备乙醇。将该水解产物用作发酵糖源由天然类型酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在摇瓶中转化为乙醇。水解产物以 10% (v/v) 的浓度使用, 其余为由 10g/L 酵母提取物和 20g/L 蛋白胨组成的水培养基。在 250mL 挡板烧瓶中的 50mL 培养物中培养酵母。将培养物在 30℃ 下以 250rpm 的摇动温育 24 小时。所产生的乙醇的量是通过实施例 9 所描述的 HPLC 测定的, 来自两个完全相同的烧瓶的结果列于下表 13 中。

[0216] 表 13 : 酵母发酵的底物利用率和产物构成

[0217]

	时间零点的肉汤	烧瓶 1, 24 hr	烧瓶 2, 24 hr
葡萄糖 (g/L)	13.9	1.3	0.9
乙醇 (g/L)	0	4.1	4.3
葡萄糖的利用	0	91%	94%

[0218] 实施例 16

[0219] 通过对来自极低浓度的氨预处理并糖化的玉米芯生物质的水解产物进行乳酸菌发酵来制备乳酸

[0220] 实施例 10 中用于制备 1,3- 丙二醇的相同水解产物也可以用于通过短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 在摇瓶中的发酵来制备乳酸。水解产物以 10% (v/v) 的浓度使用, 其余为由 5g/L 酵母提取物、10g/L 蛋白胨、2g/L 柠檬酸铵、5g/L 乙酸钠、0.1g/L MgSO_4 、0.05g/L MnSO_4 和 2g/L K_2HPO_4 和 1g/L 的 Tween 组成的水培养基。在 250mL 挡板烧瓶中的 50mL 肉汤中培养乳酸菌。将两份完全相同的培养物在 34°C 下以 150rpm 的摇动温育 24 小时。所产生的乳酸的量是通过实施例 10 所描述的 HPLC 测定的, 并且将其列于表 14 中。两个烧瓶 2 中的样品是相同培养物的平行试验。

[0221] 表 14: 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 发酵的底物利用率和产物构成

[0222]

	时间零点的肉汤	烧瓶 1, 24 hr	烧瓶 2, 24 hr	烧瓶 2, 24 hr
葡萄糖 (g/L)	25.1	4.6	3.9	3.3
乳酸 (g/L)	0	8.8	6.2	6.4
葡萄糖利用率	0	82%	84%	87%

[0223] 实施例 17

[0224] 较高干生物质浓度下用极低浓度的氨进行的玉米芯预处理

[0225] 将完整的玉米芯用颚空隙大约为 0.95cm 的颚式粉碎机 (2.2kW 电动机), 接着用破块机 (1.5kW 电动机, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ) 进行处理, 随后用装有 1.9cm 美国标准筛的 Sweco 筛进行过筛。将大约 805g 粉碎的玉米芯装入 PEH 反应器。玉米芯的含水量大约为 7%。在装料之前用氮气冲洗反应容器中的气体 5 次。在开始实验之前将没有研磨介质的反应器预热到 75°C, 此时不进行旋转。当反应容器内部的温度稳定在 75°C 时启动保温箱中的旋转装置并将转速调节到 19rpm。然后向反应器中泵入适当量的稀氢氧化铵溶液以给出 6g 氨 / 100g 生物质干重的氨浓度和 50g 生物质干重 / 100g 生物质 - 氨混合物总重的固体浓度。1g / 100g 生物质干重的乙醇也被加入到溶液中。将氨溶液泵送通过加热到 ~ 75°C 的水浴中的加热环, 所述水浴使用 2- 加仑的 Parr 反应器制造。通过喷射枪将加热的稀氢氧化铵溶液注入到反应容器中, 并喷射到在反应器中旋转翻滚的粉碎玉米芯上。将反应器在 75°C 下保温 2hr, 同时在 19rpm 下转动。在时间结束时, 对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 30 分钟以除去氨并将反应器所含物质的温度降到大约 50°C。然后将二氧化碳注入到反应器中以解除真空并将反应器加压到 103kPa 的 CO_2 表压, 在 50°C 下保持该压力

30min。

[0226] 此后,将反应器解压、打开并加入研磨介质。通过使用喷射枪注入 pH 为 4.8 的 1M 柠檬酸缓冲液将所含物质的 pH 调节到大约 5.5,为了使柠檬酸缓冲液的浓度增加到~75mM,另外加入柠檬酸一水化物。并不是所有的氨都在真空步骤中被除去或者与 CO₂ 中和。将柠檬酸缓冲液注入到反应器中随后加热到 50℃,接着通过将反应器在 50℃和 19rpm 下保温 1 小时而使所含物质达到平衡。在反应器旋转的时候使用喷射枪注入柠檬酸缓冲液从而在预处理过的玉米芯颗粒上提供更加均匀的缓冲液喷雾和分布。将反应器从保温箱中移出、打开并测定样品的 pH。如果 pH 高于 5.5,则接着加入额外的固体柠檬酸一水化物并将反应器在搅拌下在 50℃额外保温 1 小时。重复该过程直到 pH 为大约 5.5。一达到预期的 pH,就向反应器中充入 12.9mg/g 纤维素的 Spezyme CP (Genencor) 和 5mg 活性蛋白质 /g 纤维素的酶聚生体,所述酶聚生体由 β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶、β-木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖酶组成。将反应器在 50℃和 19rpm 的保温箱中保持 72hr。经上述预处理和糖化后,葡萄糖单体的产率为 62.0%,木糖单体的产率为 31.0%。总葡萄糖的产率为 75.2%,总木糖的为 80.3%。

[0227] 实施例 18

[0228] 较高固体浓度下用极低浓度的氨以及替代条件进行的玉米芯预处理

[0229] 将完整的玉米芯用锤磨机 (10- 英尺锤磨机, Glen Mills Inc., Clifton, NH) 加工以通过 1.27cm 的筛子。将大约 805g 粉碎的玉米芯装入 PEH 反应器中。玉米芯的含水量大约为 7%。22 个陶瓷研磨圆筒 (3.2cm 直径 × 3.2cm 长 ;E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) 也被加入到反应器中。在实验开始前,将反应器预热到 95℃,此时不旋转。在开始前对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 并且将容器密封。当反应容器内部的温度稳定在 95℃时,开启保温箱中的旋转装置并将转速调节到 19rpm。然后向反应器泵入适当量的稀氢氧化铵溶液以提供 6g 氨 /100g 生物质干重的氨浓度和 50g 生物质干重 /100g 生物质-氨混合物总重的固体浓度。将氨溶液泵送通过沸水浴中的加热环,所述沸水浴是使用 2- 加仑的 Parr 反应器制造的。通过喷射枪将加热的稀氢氧化铵溶液注入到反应容器中,并喷射到在反应器中旋转翻滚的粉碎玉米芯上。将反应器在 95℃保温 2hr,同时在 19rpm 下转动。在时间结束时,对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 30 分钟从而除去氨并将反应器所含物质的温度降到大约 50℃。接着将二氧化碳注入到反应器中以解除真空并将反应器加压到 103kPa 的表压,在 50℃下保持该压力 30 分钟。

[0230] 此后,将反应器解压、打开并通过注入 pH 为 4.8 的 1M 柠檬酸缓冲液将所含物质的 pH 调节到大约 5.5,所述缓冲液中加入并溶解了柠檬酸一水化物。将柠檬酸缓冲液注入到反应器后接着加热到 50℃,然后将反应器在 50℃和 19rpm 下保温 1 小时而使所含物质达到平衡。在反应器旋转时使用喷射枪注入柠檬酸缓冲液从而在预处理过的玉米芯颗粒上提供更加均匀的缓冲液喷雾和分布。将反应器从保温箱中移出、打开并测定样品的 pH。如果 pH 高于 5.5,则接着加入额外的固体柠檬酸一水化物并将反应器在搅拌下在 50℃额外保温 1 小时。重复该过程直到 pH 为大约 5.5。一达到预期的 pH,就向反应器中装入 12.9mg/g 纤维素的 Spezyme CP (Genencor) 和 5mg 活性蛋白质 /g 纤维素的酶聚生体,所述酶聚生体由 β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶、β-木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖酶组成。将反应器在 50℃和 19rpm 的保温箱中保持 72 小时。经上述预处理和糖化后,葡萄糖单体的产率为 50.7%,木

糖单体的产率为 35.7%。总葡萄糖和木糖的产率分别为 71.7%和 89.8%。

[0231] 实施例 19

[0232] 用极低浓度的氨和另外的碱进行的玉米芯预处理

[0233] 将完整的玉米芯用颚空隙大约为 0.95cm 的颚式粉碎机 (2.2kW 电动机),接着用破块机 (1.5kW 电动机, Franklin Miller Inc.) 进行处理,随后用装有 1.9cm 美国标准筛的 Sweco 筛进行过筛。将大约 460g 粉碎的玉米芯装入 PEH 反应器。玉米芯的含水量大约为 7%。在开始实验之前将反应器预热到 95℃,此时不进行旋转。开始前对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 并将容器密封。当容器内部的温度重新稳定在 95℃时启动保温箱中的旋转装置并将转速调节到 19rpm。然后向反应器中泵入适当量的氢氧化铵溶液以给出 3.2g 氨/100g 生物质干重的氨浓度,以及 NaOH 以提供 1.9gNaOH/100g 生物质干重的 NaOH 浓度,同时保持 30g 生物质干重/100g 生物质-氨混合物总重的固体浓度。将氨和另外的碱溶液泵送通过沸水浴中的加热环,所述沸水浴是使用 2- 加仑的 Parr 反应器制造的。通过喷射枪将加热的稀氢氧化铵溶液注入到反应容器中,并喷射到在反应器中旋转翻滚的粉碎玉米芯上。注入后,将容器上的真空度解除至大气压。将反应器在 95℃下保温 30min,接着将温度降到 85℃并在该温度下保持 4 小时。在时间结束时,对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 30 分钟以除去氨并将反应器所含物质的温度降到大约 50℃。接着将二氧化碳注入到反应器中以解除真空并将反应器加压到 103kPa 的表压,在 50℃保持该压力 30 分钟。

[0234] 此后,将反应器解压、打开并通过注入大约 75ml 的 pH 为 4.8 的 1M 柠檬酸缓冲液将所含物质的 pH 调节到大约 5.5,所述缓冲液中加入并溶解了柠檬酸一水化物。将柠檬酸缓冲液注入到反应器中接着加热到 50℃,然后将反应器在 50℃和 19rpm 下保温 1 小时而使所含物质达到平衡。在反应器旋转的时候使用喷射枪注入柠檬酸缓冲液从而在预处理过的玉米芯颗粒上提供更加均匀的缓冲液喷雾和分布。将反应器从保温箱中移出、打开并测定样品的 pH。如果 pH 高于 5.5,则接着加入额外的固体柠檬酸一水化物并将反应器在搅拌下在 50℃额外保温 1 小时。重复该过程直到 pH 为大约 5.5。一达到预期的 pH,就向反应器中充入 28.4mg/g 纤维素的 Spezyme CP (Genencor) 和 28.4mg/g 纤维素的 Multifect。将反应器在 50℃和 19rpm 的保温箱中保持 72hr。经上述预处理和糖化后,葡萄糖单体的产率为 56.1%,木糖单体的产率为 39.5%。总葡萄糖和木糖的产率分别为 82.8%和 84.2%。这些值是两次实验的平均值。

[0235] 实施例 20

[0236] 室温和极低浓度氨的预处理

[0237] 将完整的玉米芯用颚空隙大约为 0.95cm 的颚式粉碎机 (2.2kW 电动机),接着用破块机 (1.5kW 电动机, Franklin Miller Inc.) 进行处理,随后用装有 1.9cm 美国标准筛的 Sweco 筛进行过筛。将大约 460g 粉碎的玉米芯装入 PEH 反应器。玉米芯的含水量大约为 7%。22 个陶瓷研磨圆筒 (3.2cm 直径×3.2cm 长; E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH) 也被加入到反应器中。在开始之前对反应容器抽真空 (大约 85kPa) 并将容器密封。当反应器内部的温度重新稳定在室温 (22-26℃) 时启动保温箱中的旋转装置并将转速调节到 19rpm。然后向反应器中泵入适当量的稀氢氧化铵溶液以提供 4g 氨/100g 生物质干重的氨浓度,同时保持 30g 生物质干重/100g 生物质-氨混合物总重的固体浓度。通过喷射枪将稀氢氧化铵溶液注入到反应容器中,并喷射到在反应器中旋转翻滚的粉碎玉米芯上。注入

后,将各个容器上的真空度解除恢复到大气压。将反应器在室温(22-26℃)下保持 24hr。在时间结束时,对反应容器抽真空(大约 81kPa)30 分钟以除去氨。接着将二氧化碳注入到反应器中以解除真空并用 CO₂ 将反应器加压到 103kPa 的表压,在室温下保持该压力 30 分钟。

[0238] 此后,将反应器解压、打开并通过加入柠檬酸一水化物然后加热到 50℃将所含物质的 pH 调节到大约 5.5,然后将反应器在 50℃和 19rpm 下保温 1 小时而使所含物质达到平衡。将反应器从保温箱中移出、打开并测定样品的 pH。如果 pH 高于 5.5,则接着加入额外的固体柠檬酸一水化物并将反应器在搅拌下在 50℃额外保温 1 小时。重复该过程直到 pH 为大约 5.5。一达到预期的 pH,就向反应器中装入 12.9mg/g 纤维素的 Spezyme CP(Genencor) 和 5mg 活性蛋白质 /g 纤维素的酶聚生体,所述酶聚生体由 β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶、β-木糖苷酶和阿拉伯呋喃糖酶组成。将反应器在 50℃和 19rpm 的保温箱中保持 72 小时。经上述预处理和糖化之后,葡萄糖单体的产率为 41.7%,木糖单体的产率为 25.4%。总葡萄糖和木糖的产率分别为 50.1%和 53.2%。这些值是两次实验的平均值。

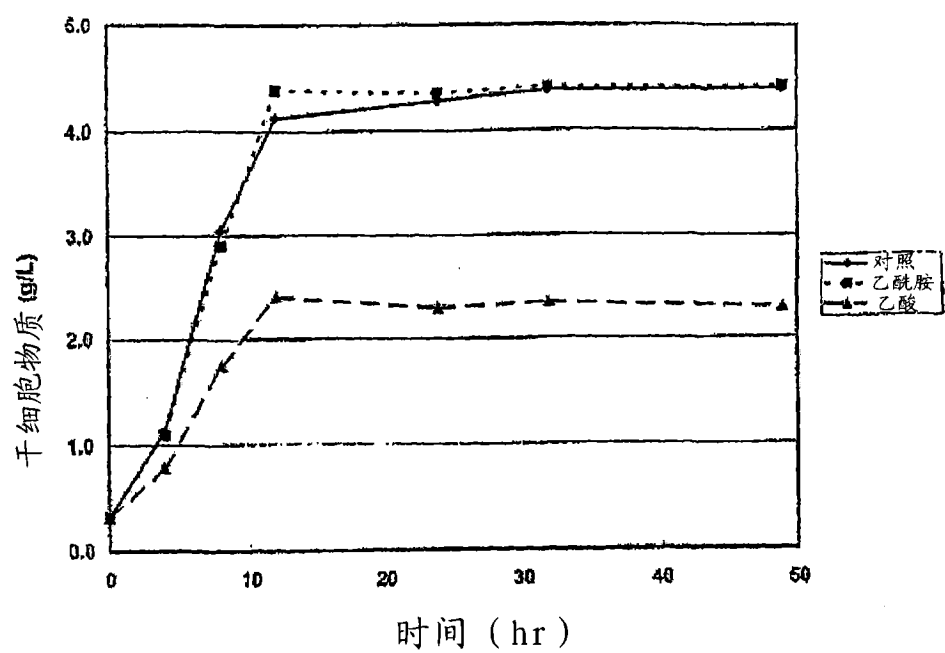


图 1